

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

PCT/DE 00/00525

097913927

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



DE00/525

REC'D 10 MAY 2000

WIPO PCT

**Bescheinigung**

Die Herren Privat-Dozent Dr. Ulrich Schubert in Uhlstädt/Deutschland,  
Dr. Peter Henklein in Berlin/Deutschland und Dr. Victor Wray in Wolfen-  
büttel/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Synthetische Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr)  
des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)"

am 19. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
C 07 K 14/16 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. April 2000.

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 08 752.0

Brand



# Synthetische Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)

## 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft synthetische (s) Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), insbesondere die chemische Totalsynthese des 96 Aminosäure langen Vpr-Proteins (sVpr1-96) sowie seiner Sequenzen. Als synthetische 10 Vpr-Peptide finden sie Verwendung in biologischen Assays, in der Analyse der molekularen Struktur und den physikochemischen Eigenschaften von Vpr und dessen Domänen sowie zur Erzeugung von Antikörpern gegen Vpr-Peptidsequenzen.

Die bislang einzige *in vitro* charakterisierte biochemische Aktivität von Vpr ist die eines Kationen-selektiven Ionenkanals (Piller *et al.*, 1996, - Literaturverzeichnis am Ende der Ausführungsbeispiele). Diese Arbeiten basierten auf der Annahme, daß die C-terminale alpha Helix (Positionen 46 bis 71 in Vpr), welche Ähnlichkeiten zu der Bienengift-Komponente Melittin besitzt, als Transmembrananker eine Membranpore ausbilden kann. Tatsächlich konnte rekombinantes, in *Escherichia (E.) coli* exprimiertes Vpr in künstlichen planaren 20 Lipidbilayern rekonstituiert werden. Dadurch wurde eine durch das Membranpotential regulierbare Ionenkanalaktivität ermittelt, deren Regulierbarkeit von der basischen C-terminalen Region abhängt, welche mit der negativ geladenen zytoplasmatischen Seite der Zellmembran in Wechselwirkung treten soll.

Es liegen Hinweise für Homooligomerisierung von Vpr vor: Ein rekombinantes Vpr- 25 Fusionsprotein bildet oligomere Strukturen mit Molekulargewichten von >100 kDa (Zhao *et al.*, 1994b), eine Beobachtung, die bislang an viralen Vpr nicht bestätigt wurde.

Untersuchungen zur molekularen Struktur von Vpr wurden durch zwei Gruppen mittels Sekundärstruktur-Analysen an kurzen Vpr-Peptiden durchgeführt: NMR-Studien an überlappenden Peptiden in wässrigem Trifluorethanol (TFE) sowie in 30 Natriumdodecylsulfat(SDS)-Mizellen identifizierten alpha-helikale Regionen in den Vpr-Positionen 50-82. (Yao *et al.*, 1998). Das Potential zur Helix-Bildung in der C-terminalen als auch der N-terminalen Region von Vpr wurde zuvor von verschiedenen Autoren vorhergesagt (Mahalingam *et al.*, 1995a-d; Yao *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996b). Neuere Studien mittels CD-Spektroskopie in TFE-haltigen Lösungen an 25 Aminosäure langen Peptiden (Luo *et al.*, 35 1998) zeigten erste experimentelle Hinweise für die Existenz der N- und C-terminalen Helices in Vpr. Zahlreiche und zum Teil in ihrer Aussage kontroverse Mutationsanalysen haben versucht, die verschiedenen Primär- und Sekundärstrukturen einzelnen biologischen Aktivitäten von Vpr zuzuordnen (Mahalingam *et al.*, 1995a-d, 1997; Wang *et al.*, 1996a,b; Nie

et al., 1998; Di Marzio et al., 1995).

Über die chemische Vollsynthese eines Vpr-Proteins wurde erstmals 1997 von Rocquigny und Mitarbeitern berichtet. Die Autoren beschrieben die Synthese eines 96 Aminosäure großen Peptides, welches von dem Virusisolat HIV-1<sub>89.6</sub> (Collman et al. 1992) abstammt. Neben den in 5 dieser Arbeit beschriebenen Nachteilen (siehe im weiteren Text) ist dieses Protein in 9 Aminosäurepositionen unterschiedlich zu Vpr von HIV-1<sub>NL4-3</sub>, dessen Darstellung in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung erstmalig berichtet wird. Somit besteht eine 10%-ige Divergenz zwischen den bereits beschriebenen (Rocquigny et al., 1997) und dem in den vorliegenden Verfahren dargestellten Produkten, welche die Gesamt- und Teilsequenzen des 10 Vpr-Proteins von HIV-1<sub>NL4-3</sub> (Adachi et al., 1986) betreffen.

Rocquigny und Mitarbeitern (1997) geben keine Angaben über die Reinheit sowie die physikochemischen Eigenschaften des Vpr-Peptides an. Es wird lediglich mittels der Far-Westernblot Technik gezeigt, daß SDS-denaturiertes Vpr-Peptid mit dem viralen Nukleoprotein NCp7 des gleichen HIV-1-Isolates in Wechselwirkung tritt. Dieser Befund der NCp7-Vpr-Wechselwirkung konnte bislang von keiner der zahlreichen anderen auf dem Vpr-Gebiet forschenden Gruppen bestätigt werden. Wesentlicher Nachteil dieser Vpr-Synthese ist die Tatsache, daß für dieses Peptid keine der beschriebenen biologischen Aktivitäten durch die Autoren gezeigt wurde. Insbesondere wird gezeigt, daß dieses Vpr-Peptid nicht an p6<sup>Gag</sup> bindet, eine weithin akzeptierte Eigenschaft von Vpr (Paxton et al., 1993; Lavallee et al., 1994; 20 Kondo et al., 1995; Lu et al., 1995; Kondo und Göttlinger, 1996). Darüber hinaus wird beschrieben, daß dieses Peptid keine Oligomeren bildet, und es liegen Hinweise vor, daß dieses Peptid in rein wässrigem System unlöslich ist. Von dem gleichen Labor wird in einer weiteren Studie (Roques et al., 1997) ein Modell der Vpr-NCp7-Wechselwirkung vorgestellt, 25 welches auf Strukturanalysen an Teilsequenzen dieser Peptide basiert. Die Daten dazu werden jedoch in dieser Arbeit oder anderen Veröffentlichungen der Autoren nicht näher beschrieben.

Teilsequenzen von Vpr (Positionen 50-75, 50-82 und 59-86) wurden für NMR-Studien an synthetischen Peptiden eingesetzt (Yao et al., 1998). Eine andere Gruppe hat zwei 25 Aminosäure lange Peptide aus den Bereichen der vorhergesagten alpha-helikalen Domänen 30 in Vpr mittels CD-Spektroskopie untersucht (Luo et al., 1998):

Kurze, ca. 20 Aminosäure lange Peptide der C-terminalen Region von Vpr, welche das Motiv "HF/SRIG" enthalten, haben in einer Konzentration von 0.7 bis 3 micro-M zytotoxische Wirkungen gegenüber verschiedenen Hefe-Stämmen, wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und *Schizosaccharomyces pombe* (Macreadie et al., 1996, 1997) 35 auslöst. Eine erhöhte Konzentration von bivalenten Kationen, insbesondere Magnesium und Kalzium, verhindert die Aufnahme der Vpr-Peptide und dadurch deren toxische Effekte. Weiterführende Studien zeigten, daß ein C-terminales Vpr-Peptid (Positionen 71-82) die Membranpermeabilisierung, weiterhin eine Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials

und letztendlich den Zelltod von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirkt (Macreadie et al., 1997). Schließlich wurden ähnliche toxische Effekte ebenfalls für Gesamt-Vpr demonstriert (Arunagiri et al., 1997). Dazu wurde das gleiche rekombinante Glutathione S-Transferase(GST)-Vpr-Fusionsprotein eingesetzt, welches zuvor für Ionenkanalstudien an Vpr verwendet wurde

5 (Piller et al., 1996). Jedoch berichten die Autoren ebenfalls über Probleme mit der Löslichkeit des rekombinanten Produktes in wässrigen Systemen.

Rekombinantes Vpr des Isolates HIV-1<sub>NL4-3</sub> wurde in Insektenzellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren exprimiert (Levy et al., 1995). Die Reinigung des Produktes erfolgte lediglich durch Immunaffinitätschromatographie an immobilisiertem polyklonalen

10 Antiserum, welches gegen die N-terminale Domäne von Vpr gerichtet ist. Dazu wurden Zellkulturüberstände eingesetzt, da rekombinantes Vpr unspezifisch in das Kulturmedium sekretiert wird. Reinigungsstrategien für die Produktion größerer Mengen an rekombinanten Vpr wurden nicht beschrieben. In den meisten Fällen wurden von Autoren Vpr-haltige Zellkulturüberstände für biologische Tests verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, daß rekombinantes Vpr die Virusreplikation in PBMC (peripheral blood mononuclear cells) und in verschiedenen latent infizierten Monozyten- und T-Zelllinien aktiviert. Wesentliche Nachteile dieses Verfahrens sind:

- geringe Ausbeute und keine Möglichkeit zur Herstellung von mg-Mengen an hochreinem Produkt;

20 - rekombinantes Vpr wurde im Prozeß der Affinitätsreinigung mit Detergentien versetzt, wodurch Dialyse und Renaturierung notwendig wurden;

- Studien zu einer möglichen posttranslationalen Modifizierung von Vpr in Insektenzellen wurden nicht beschrieben;

- die Wirkung von rekombinanten Vpr in HIV-infizierten primären Monozyten / Makrophagen

25 wurde nicht getestet.

Expression, Reinigung sowie biochemische Charakterisierung von rekombinanten Vpr wurden erstmals 1994 von Zhao und Mitarbeitern beschrieben. Dazu wurde die kodierende Sequenz des Vpr-Proteins des Isolates HIV-1<sub>89.6</sub> in *E. coli* als Fusionsprotein exprimiert. Zum Zweck der Reinigung und des Nachweises wurde in diesem Verfahren C-terminal eine 25 Aminosäuren

30 lange Sequenz des heterologen FLAG-Epitopes fusioniert. Außer der Oligomerisierung wurde über keine biologischen Aktivitäten des rekombinanten Produktes in dieser Arbeit berichtet. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß Vpr nicht in seiner authentischen Sequenz, sondern als Fusionsprotein exprimiert wird.

In einem weiteren Verfahren wurde Vpr des Isolates HIV-1<sub>HXB2</sub> in *E. coli* als GST-

35 Fusionsprotein exprimiert (Piller et al., 1996). Nach Affinitätschromatographie an Glutathione-Agarose wurde Vpr durch Thrombin-Spaltung vom Fusionsanteil befreit. Wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß Vpr nach Spaltung eine starke Tendenz zur Aggregation besitzt und nicht in wässriger Lösung gehalten werden kann. So berichten zum

Beispiel Arunagiri und Mitarbeiter (1997), daß mit diesem Verfahren hergestelltes rekombinantes Vpr nach Abspaltung des GST-Fusionsanteils nicht in Lösung gehalten werden kann, sondern nur durch Beibehaltung des heterologen Fusionsanteils Vpr in wässrigen Systemen getestet werden konnte.

5 In der Patentanmeldung WO 95/26361 (Azad, A.A., Macreadie, I.G., Arunagiri, C., 1995) werden biologisch aktive Peptidfragmente des Vpr-Proteins von HIV beschrieben; pharmazeutische Verbindungen, welche diese Peptide oder biologisch aktive Analoga davon enthalten; Antagonisten der Vpr-Peptide sowie pharmazeutische Verbindungen, welche diese Vpr-Antagonisten enthalten. Die chemische Synthese von Gesamt-Vpr-Protein spielt darin

10 keine Rolle.

In der WO 96/07741 (Cohen, E.; Bergeron, D.; Checroune, F.; Yao, X.-J.; Pignac-Kobinger, G., 1996) werden chimere Moleküle unter Schutz gestellt, bestehend aus Vpr von HIV-1 und Vpx von HIV-2, welche spezifisch in HIV-1/HIV-2-Viruspartikel eingebaut werden können und dort die strukturelle Organisation und funktionelle Integrität von Virionen stören. Sie sind jedoch für den Einsatz zur Gentherapie von HIV-1/HIV-2-Infektionen ausgeschlossen.

In WO 96/08970 (Weiner, D.B.; Levy, D.N.; Refaeli, Y., 1996) werden Methoden zur Inhibierung der Zellteilung und der Lymphozyten-Aktivierung unter Anwendung von Vpr-Proteinen, Fragmenten von Vpr oder Gensequenzen von Vpr beschrieben. Die chemische Synthese von Vpr-Proteinen spielt darin keine Rolle.

20 Die Verwendung von *vpr* Genen im screening assay für anti-HIV-Arzneimittel wird in den US-Patenten 5721104 und 5639619 beschrieben, zur Bestimmung von HIV-2 in US 5580739, ein Vpr-Rezeptor-Protein in US 5780238.

A Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Syntheseweg für Vpr-Peptide im mg-

25 Maßstab zu entwickeln, ihre Reinigung zu ermöglichen, und der Allgemeinheit das Endprodukt zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch die Bereitstellung des Proteins sVpr1-96 sowie der Peptide

30 - ein 47 Aminosäuren langes N-terminales Peptid (sVpr1-47),  
- ein 49 Aminosäuren langes C-terminales Peptid (sVpr48-96) und von Fragmenten dieser Peptide, zum Beispiel  
- überlappende, etwa 15 Aminosäuren lange Peptide für die Epitop-Charakterisierung und isolelektrische Fokussierung  
35 - etwa 20 Aminosäuren lange Peptide zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung einzelner Domänen von Vpr, insbesondere die Peptide sVpr1-20 und sVpr21-40 gelöst:  
sVpr1-96:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-

Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-  
Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-  
Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-  
Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

5 sVpr1-47:

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-  
Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-  
Gln-His-Ile-Tyr-NH<sub>2</sub>

sVpr48-96:

10 Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-ieu-Phe-Ile-  
His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-  
Ala-Ser-Arg-Ser-OH

sVpr1-20 als sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>):

H-Met-Glu-Gln-Ala-Asn-Glu-Asp-Gln-Gly-Asn-Gln-Arg-Glu-Asn-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>  
und

sVpr21-40 als sVpr21-40(Asn<sup>35</sup>):

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>,  
Fragmente dieser Peptide - mit etwa 15 Aminosäuren langen Peptiden

sVpr11-25:

20 Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Glu-Glu-,

sVpr41-55:

Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala,

sVpr46-60:

Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-,

25 sVpr56-70:

Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-ieu-Phe-Ile,

sVpr66-80:

Gln-Leu-ieu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg,

sVpr76-96:

30 Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH,

Die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide erfolgte an einem Serin-Harz mit Hilfe eines Perkin-Elmer-Synthesizers. Alle N-terminalen Peptide wurden an einem Polystyren-Polyoxyethylen-Trägerharz synthetisiert. Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels

35 FMOC(Fluormethyloxycarbonyl)-Strategie unter Verwendung von Schutzgruppen. Nach Beendigung der Synthese erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde. Das Harz wurde abgetrennt, die

Reaktionslösung eingeengt und mit Heptan versetzt. Es wurde erneut eingeengt und das verbleibende Öl mit Diethylether digeriert. Das rohe Peptid wurde abgesaugt und anschließend aus Essigsäure lyophilisiert. Zur Reinigung wurden die Rohpeptide an einer präparativen HPLC-Anlage (High Pressure Liquid Chromatography) chromatographiert. Alle

5 Peptide wurden an einer Kieselgelsäule mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und TFA in Acetonitril gereinigt. Die Eluate wurden eingeengt und lyophilisiert.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die erfindungsgemäß hergestellten sVpr-Peptide nach dieser Reinigungsprozedur - im Unterschied zu den bislang beschriebenen 10 rekombinanten oder synthetischen Produkten - wasserlöslich sind und selbst in hohen Konzentration von bis zu mM-Lösungen keiner Proteinaggregation unterliegen. Es konnte gezeigt werden, daß das Protein sVpr1-96 eine gefaltete Struktur annimmt, biologische Aktivitäten vergleichbar mit viralen Vpr hat und immunologisch reaktiv ist.

Erstmals wird die chemische Synthese des Vpr-Proteins und seiner Fragmente beschrieben, welcher der Aminosäuresequenz des Virusisolates HIV-1<sub>NL4-3</sub> entspricht.

Unter dem Begriff synthetische (s) Vpr-Peptide werden im Rahmen der vorliegenden Erfindungsbeschreibung die durch Festphasensynthese hergestellten Peptide verstanden, welche die authentische Aminosäuresequenz des nativen Vpr-Proteins enthalten, so wie dieses durch das *vpr* Gen des molekularen Isolates HIV-1<sub>NL4-3</sub> kodiert wird.

20 Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Merkmale (Ausgangsstoffe, Syntheseharze, Synthesizer) und neuer Lösungswege – der erstmaligen chemischen

Synthese dieser Verbindungen, der Synthesestrategie, der Wahl der spezifischen Schutzgruppen, dem erfindungsgemäßen Abspaltungsgemisch Trifluoressigsäure-Triisopropylsilan-Ethandithiol, dem Einsatz eines bestimmten Lösungsmittelgradienten (TFA-

25 Wasser- : TFA-Acetonitril für die Reinigung - die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr neue synthetisch hergestellte sVpr-Peptide zur Verfügung stehen.

Die erfindungsgemäß hergestellten synthetischen Peptide zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus:

30 Sie haben eine extrem gute Löslichkeit in wässrigen Systemen, welche bis zu mM konzentrierte Peptid-Lösungen erlauben. Dies wiederum ist Voraussetzung für nachfolgende Strukturanalysen von Vpr mittels NMR(Nuclear Magnetic Resonance)-spektroskopischer und RKSA(Röntgenkristallstrukturanalyse)-Techniken.

Die Peptide lassen sich unter ökonomisch vertretbaren Bedingungen im mg-Maßstab 35 herstellen und bis zu einem hohen Reinheitsgrad anreichern. Sie zeigen immunogene und biologische Eigenschaften, welche identisch sind mit denen von natürlichen Vpr-Proteinen. Sie lassen sich für vielfältige Gebiete der Grundlagenforschung sowie der angewandten Forschung auf dem Gebiet der HIV-Virologie einsetzen.

Die erfindungsgemäßen Peptide finden Verwendung in biologischen Assays, in der Strukturanalyse von Vpr und dessen Domänen, zur Erzeugung von Antikörpern gegen HIV-Peptidsequenzen, in antiviralen Reagenzien, zum Aufbau von Testsystemen zum Screenen von potentiellen Vpr-Antagonisten, bei der Etablierung von Zellkultur- und Tiermodellen, zur

5 Untersuchung der Pathomechanismen von Vpr, für die *in vitro* Assemblierung von neuartigen Vektoren für den Einsatz bei Gentransfermethoden in der Gentherapie und zur Entwicklung von serologischen Testmethoden, insbesondere eines Vpr-Antigen-ELISA.

Die erfindungsgemäß hergestellten Produkte können für die Aufklärung der molekularen Struktur von Vpr mittels NMR- und CD-spektroskopischen Methoden sowie der Kristallisation

10 und nachfolgender RKSA eingesetzt werden. Diese Informationen wiederum sind essentiell für das Verständnis der molekularen Wirkungsweise des Vpr-Proteins im HIV-1-Replikationszyklus und der damit verbundenen Pathomechanismen einer AIDS-Erkrankung sowie dem molekularen Design von potentiellen Vpr-Antagonisten.

Weiterhin können mit diesen Produkten *in vitro* Testsysteme dargestellt werden, welche das intensive Screening von potentiellen anti-Vpr-wirksamen Reagenzien erlauben. Darüber hinaus können sie für die Erzeugung und Testung von Vpr-spezifischen Antikörpern und für serologische Testverfahren angewendet werden.

Die Erfindung wird in der Peptidchemie, der virologischen Grundlagenforschung, der Strukturanalyse sowie der medizinischen Diagnostik angewendet.

20 Sie soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf sie beschränkt zu sein.

### **Ausführungsbeispiele**

25

#### Beispiel 1:

##### **Synthese von Vpr-Peptiden - Allgemeine Vorschrift**

Die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide erfolgte an einem Serin-Harz der Fa. Rapp

30 Polymere Tübingen an einem ABI 433A Synthesizer (Perkin Elmer).

Alle N-terminalen Peptide wurden an einem Polystyren-polyoxyethylen-Trägerharz (TentaGel R-RAM-Harz der Fa. Rapp Polymere) synthetisiert.

Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels Fmoc(Fluormethyloxycarbonyl)-Strategie unter Verwendung nachfolgender Schutzgruppen: O-t. Butylester für Glu und Asp, O*t*Bu-Ether für 35 Serin, Tyrosin und Threonin, Boc (tert-Butoxycarbonyl-) für Lysin und Tryptophan, Trt (Trityl - Triphenylmethyl-) für Histidin, Glutamin und Asparagin sowie Pbf (2.2.4.6.7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-) für Arginin.

Nach Beendigung der Synthese erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines

Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde. Das Harz wurde abgetrennt, die Reaktionslösung eingeengt und mit Heptan versetzt. Es wurde erneut eingeengt und das verbleibende Öl mit Diethylether digeriert. Das rohe Peptid wurde abgesaugt und anschließend aus 10%iger Essigsäure lyophilisiert.

### Beispiel 2:

## Reinigung der Peptide - Allgemeine Vorschrift

Zur Reinigung wurden jeweils 100 mg Rohpeptid an einer präparativen HPLC-Anlage (Shimadzu LC-8 Anlage) chromatographiert. Alle Peptide wurden an einer Kieselgelsäule (300 x 400 mm Vydac-RP18-Säule, Korngröße 15 - 20  $\mu$ M) mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus A = 1% TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und B = 0,1% TFA in 80%igem Acetonitril mit einem Fluss von 100 ml / min gereinigt. Die Eluate wurden eingeengt und lyophilisiert.

### Beispiel 3:

sVpr1-96

Das Peptid wurde an einem TentaGel S-AC-Harz (0,20 mmol/Gramm) an einem ABI 433 aufgebaut. Am Schluß der Synthese wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, das Harz 20 nacheinander mit Dimethylformamid und Methylenechlorid gewaschen und getrocknet. Das Peptid wurde dann in der eingangs beschriebenen Weise vom Harz abgespalten und anschließend gereinigt.

Molmasse: 11378 gef. 11381

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

30 Figur 1: sVpr1-96 - Direkte Auftrennung im SDS-PAGE (A)  
Immunpräzipitation vor SDS-PAGE (B)

Figur 2: sVpr1-96 - Präparative Reinigung des Rohpeptids - HPLC-Chromatogramm

Figur 3: sVpr1-96 - Massenspektrum (% Int. und Molmasse)

### 35 Beispiel 4:

sVpr1-47

Analog zu Beispielen 1 bis 3.  
Molmasse: 5728 gef. 5728.8  
H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-  
5 Gln-His-  
Ile-Tyr-NH<sub>2</sub>

Figur 4: sVpr1-47 - Massenspektrum (% Int. und Molmasse)

Beispiel 5:

10 sVpr48-96

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

15

Beispiel 6:

sVpr1-20

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>

20 Figur 5: sVpr1-20 - Massenspektrum (%Int. 10% =111 mV[sum= 9505 mV] Profiles  
1-85 Unsmoothed und Molmasse)

Beispiel 7:

sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>)

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>

Beispiel 8:

sVpr21-40

30 Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Wildtyp-Sequenz

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>

Figur 6: sVpr21-40 - Massenspektrum (%Int. 10% =335 mV[sum= 28541 mV] Profiles  
1-85 Unsmoothed und Molmasse)

Beispiel 9:

sVpr21-40(Asn<sup>35</sup>)

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

5 H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>

Beispiel 10:

sVpr11-25:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

10 Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Glu-Glu-

Beispiel 11:

sVpr41-55:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

15 Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala

Beispiel 12:

sVpr46-60:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

20 Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-

Beispiel 13:

sVpr56-70:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

25 Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Ieu-Phe-Ile

Beispiel 14:

sVpr66-80:

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

30 Gln-Leu-Leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg

Beispiel 15:

sVpr76-96

Analog zu Beispielen 1 bis 3.

Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

5 Literaturverzeichnis:

Adachi, A.; Gendelman, H. E.; König, S.; Folks, T.; Willey, R. L.; Rabson, A.; Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59:284-291.

Arunagiri, C.; Macreadie, I.; Hewish, D.; Azad, A. (1997) A C-terminal domain of HIV-1 10 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Apoptosis* 2:69-76.

Collman, J.W.; Balliet, J.W.; Greory, S.A.; Friedman, H.; Kolson, D.L; Nathanson, N.; Srinivasan, A. (1992) An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 66:5717-5721.

Di Marzio, P.; Choe, S.; Ebright, M.; Knoblauch, R.; Landau, N.R. (1995) Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J.Virol.* 69:7909-7916.

Kondo, E.; Göttlinger, H.G. (1996) A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6<sup>gag</sup> required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J.Virol.* 20 70:159-164.

Kondo, E.; Mammano, F.; Cohen, E.A.; Göttlinger, H.G. (1995) The p6<sup>gag</sup> domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J.Virol.* 69:2759-2764.

Lavallée, C.; Yao, X.J.; Ladha, A.; Göttlinger, H.G.; Haseltine, W.A.; Cohen, E.A. (1994) 25 Requirement of the Pr55<sup>gag</sup> precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* 68:1926-1934.

Levy, D.N.; Refaeli, Y.; Weiner, D.B. (1995) Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91:10873-10877.

30 Lu, Y.-L.; Bennett, R.P.; Wills, J.W.; Gorelick, R.; Ratner, L. (1995) A leucine triplet repeat sequence (LXX)<sub>4</sub> in p6<sup>gag</sup> is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 69:6873-6879.

Luo, Z.; Butcher, D.J.; Murali, R.; Srinivasan, A.; Huang, Z. (1998) Structural studies of synthetic peptide fragments derived from the HIV-1 Vpr protein. *Biochem. Biophys. Research Communications* 35 244:732-736.

Macreadie, I.G.; Arunagiri, C.K.; Hewish, D.R.; White, J.F.; Azad, A.A. (1996) Extracellular addition of a domain of HIV-1 Vpr containing the amino acid sequence motif H(S/F)RIG causes cell membrane permeabilization and death. *Mol.Microbiol.* 19:1185-1192.

Macreadie, I.G.; Kirkpatrick, A.; Strike, P.M.; Azad, A.A. (1997) Cytocidal activities of HIV-1 Vpr and SAC1P peptides bioassayed in yeast. *Protein and Peptide Letters* 4:181-186.

Mahalingam, S.; Ayyavoo, V.; Patel, M.; Kieber-Emmons, T.; Weiner, D.B. (1997) Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J.Viro.* 71:6339-6347.

Mahalingam, S.; Collman, R.G.; Patel, M.; Monken, C.E.; Srinivasan, A. (1995a) Functional analysis of HIV-1 Vpr: Identification of determinants essential for subcellular localization. *Virol.* 212:331-339.

Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995b) Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation. *Virol.* 207:297-302.

Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Murali, R.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995c) Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 92:3794-3798.

Mahalingam, S.; Patel, M.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995d) The carboxy-terminal domain is essential for stability and not for virion incorporation of HIV-1 Vpr into virus particles. *Virol.* 214:647-652.

Nie, Z.; Bergeron, D.; Subbramanian, R.A.; Yao, X.-J.; Checroune, F.; Rougeau, N.; Cohen, E.A. (1998) The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocalization of proviral-DNA in growth-arrested cells. *J.Viro.* 73:4104-4115.

Paxton, W.; Connor, R.I.; Landau, N.R. (1993) Incorporation of vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Viro.* 67:7229-7237.

Piller, S.C.; Ewart, G.D.; Premkumar, A.; Cox, G.B.; Gage, P.W. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93:111-115.

Roques, B.P.; Morellet, N.; de Rocquigny, H.; Déméné, H.; Schueler, W.; Jullian, N. (1997) Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie* 79:673-680.

de Rocquigny, H.; Petitjean, P.; Tanchou, V.; Decimo, D.; Drouot, L.; Delaunay, T.; Darlix, J.-L.; Roques, B.P. (1997) The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J. Biol. Chem.* 272(49): 30753-30759.

Wang, B.; Ge, Y.C.; Palasanthiran, P.; Xiang, S.-H.; Ziegler, J.; Dwyer, D.E.; Randle, C.; Dowton, D.; Cunningham, A.; Saksena, N.K. (1996) Gene defects clustered at the C-terminus of the *vpr* gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: *in vivo* evolution of *vpr* quasispecies in blood and plasma. *Virol.* 223:224-232.

Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O; Zhao, L.-J. (1996) Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178:7-13.

Yao, S.; Azad, A.A.; Macreadie, I.G.; Norton, R.S. (1998) Helical structure of polypeptides from the C-terminal half of HIV-1 Vpr. *Protein and Peptide Letters* 5:127-134.

5 Yao, X.-J.; Subbramanian, R.A.; Rougeau, N; Boisvert, F.; Bergeron, D.; Cohen, E.A. (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* 69:7032-7044.

Zhao, L.J.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994a) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* 269:15577-15582.

10 Zhao, L.J.; Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994b) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: oligomerization by the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269:32131-32137.

Zhao, Y.; Cao, J.; O'Gorman, M.R.; Yu, M.; Yoge, R. (1996) Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Virol.* 70:5821-5826.

**Figur 1: sVpr1-96 -** Direkte Auftrennung im SDS-PAGE (A)

20 **Figur 1: sVpr1-96 -** Immunpräzipitation vor SDS-PAGE (B)

**Figur 2: sVpr1-96 -** Massenspektrum

**Figur 3: sVpr1-96 -** Chromatogramm

25 **Figur 4: sVpr1-47 -** Massenspektrum

**Figur 5: sVpr1-20 -** Massenspektrum

30 **Figur 6: sVpr21-40 -** Massenspektrum

## Patentansprüche

1. Synthetische Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1).

5

2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um

2.1. ein 96 Aminosäuren langes Vpr-Protein (sVpr1-96)

2.2. ein 47 Aminosäuren langes N-terminales Peptid (sVpr1-47)

2.3. ein 49 Aminosäuren langes C-terminales Peptid (sVpr48-96) sowie

10 2.4. Fragmente dieser Peptide, zum Beispiel

2.4.1. überlappende, etwa 15 Aminosäuren lange Peptide für die Epitop-Charakterisierung und isolektrische Fokussierung

2.4.2. etwa 20 Aminosäuren lange Peptide zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung einzelner Domänen von Vpr, insbesondere

2.4.2.1. die Peptide sVpr1-20 und

2.4.2.2. sVpr21-40

handelt.

3. Peptide nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich

20

3.1. bei dem 96 Aminosäuren langen Vpr-Protein um

sVpr1-96

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-

25 Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Ile-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

3.2. bei dem 47 Aminosäuren langen N-terminalen Peptid um

30 sVpr1-47

H-Met-Glu-Gln-Ala-Pro-Glu-Asp-Gln-Gly-Pro-Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-NH<sub>2</sub>

35 3.3. bei dem 49 Aminosäuren langen C-terminalen Peptid um

sVpr48-96

Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Ile-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-

Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

3.4. bei den Fragmenten dieser Peptide um die etwa 15 Aminosäuren lange Peptide

3.4.1. sVpr11-25

5 Gln-Arg-Glu-Pro-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-

3.4.2. sVpr41-55

Asn-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala

3.4.3. sVpr46-60

Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Ile-

10 3.4.4. sVpr56-70

Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-leu-Phe-Ile

3.4.5. sVpr66-80

Gln-Leu-leu-Phe-Ile-His-Phe-Arg-Ile-Gly-Cys-Arg-His-Ser-Arg

3.4.6. sVpr76-96

Cys-Arg-His-Ser-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Arg-Ala-Arg-Asn-Gly-Ala-Ser-Arg-Ser-OH

3.5. bei den etwa 20 Aminosäuren langen Peptiden um

3.5.1. die Peptide sVpr1-20 als

sVpr1-20(Asn<sup>5,10,14</sup>)

20 H-Met-Glu-Gln-Ala-Asn-Glu-Asp-Gln-Gly-Asn-Gln-Arg-Glu-Asn-Tyr-Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-NH<sub>2</sub>  
und

3.5.2. sVpr21-40 als

sVpr 21-40(Asn<sup>35</sup>)

H-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-Val-Arg-His-Phe-Asn-Arg-Ile-Trp-Leu-His-NH<sub>2</sub>

25 handelt.

4. Verfahren zur Herstellung von neuen synthetischen Peptiden des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) nach den Ansprüchen

1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Synthese der C-terminalen Vpr-Peptide an einem

30 Serin-Harz mit Hilfe eines Perkin-Elmer-Synthesizers erfolgt, alle N-terminalen Peptide an einem Polystyren-Polyoxyethylen-Trägerharz synthetisiert werden und der Aufbau der Peptide mittels Fmoc-Strategie unter Verwendung von Schutzgruppen erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß nach Beendigung der Synthese

35 die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol zugesetzt wurde, erfolgt und das Harz abgetrennt wird.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Rohpeptide an einer präparativen HPLC-Anlage chromatographiert und die Peptide an einer Kieselgelsäule mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und TFA in Acetonitril, gereinigt werden.

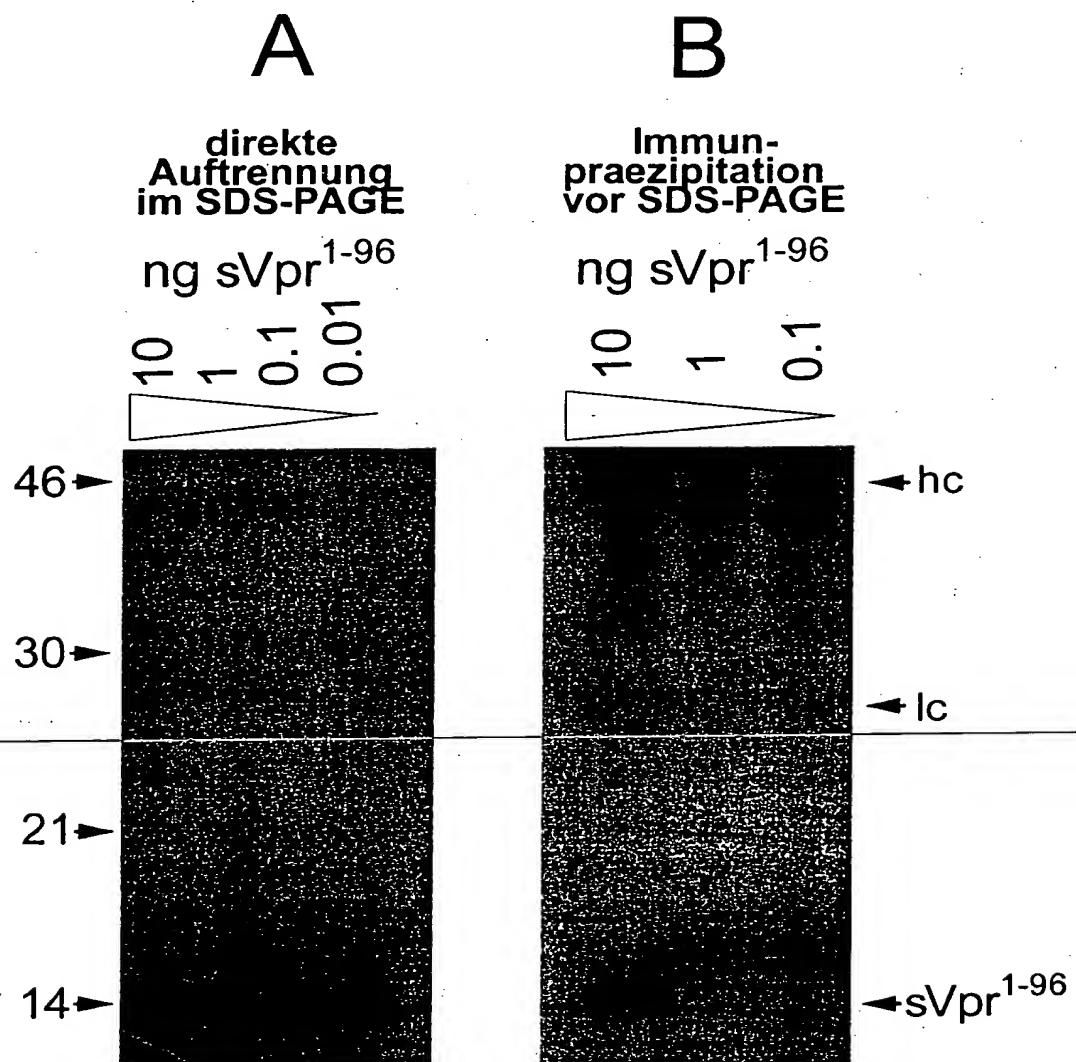
5

7. Verwendung der Peptide nach den Ansprüchen 1 bis 6 in biologischen Assays, in der Strukturanalyse von Vpr und dessen Domänen, zur Erzeugung von Antikörpern gegen HIV-Peptidsequenzen, in antiviralen Reagenzien, zum Aufbau von Testsystemen zum Screenen von potentiellen Vpr-Antagonisten, bei der Etablierung von Zellkultur- und Tiermodellen zur 10 Untersuchung der Pathomechanismen von Vpr, bei der *in vitro* Assemblierung von neuartigen Vektoren für den Einsatz bei Gentransfermethoden in der Gentherapie, und zur Entwicklung von serologischen Testmethoden, insbesondere eines Vpr-Antigen-ELISA.

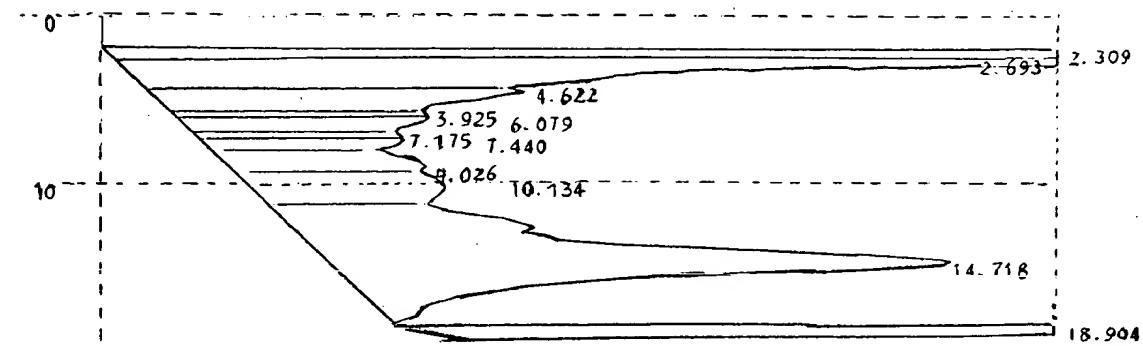
## **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft synthetische (s) Peptide des regulatorischen Virusproteins R (Vpr) des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), insbesondere die chemische Totalsynthese des 96 Aminosäuren langen Vpr-Proteins (sVpr1-96), eines 47 Aminosäuren langen N-terminalen (sVpr1-47), eines 49 Aminosäuren langen C-terminalen Fragmentes davon (sVpr48-96) sowie der Fragmente sVpr1-20 und sVpr21-40 und weiterer Fragmente mit etwa 15 Aminosäuren. Als HIV-1-regulatorische Proteine finden die Produkte Verwendung in biologischen Assays, in der Analyse der molekularen Struktur und der physikochemischen Eigenschaften von Vpr und dessen Domänen oder zur Erzeugung von Antikörpern gegen Vpr-Peptidsequenzen.

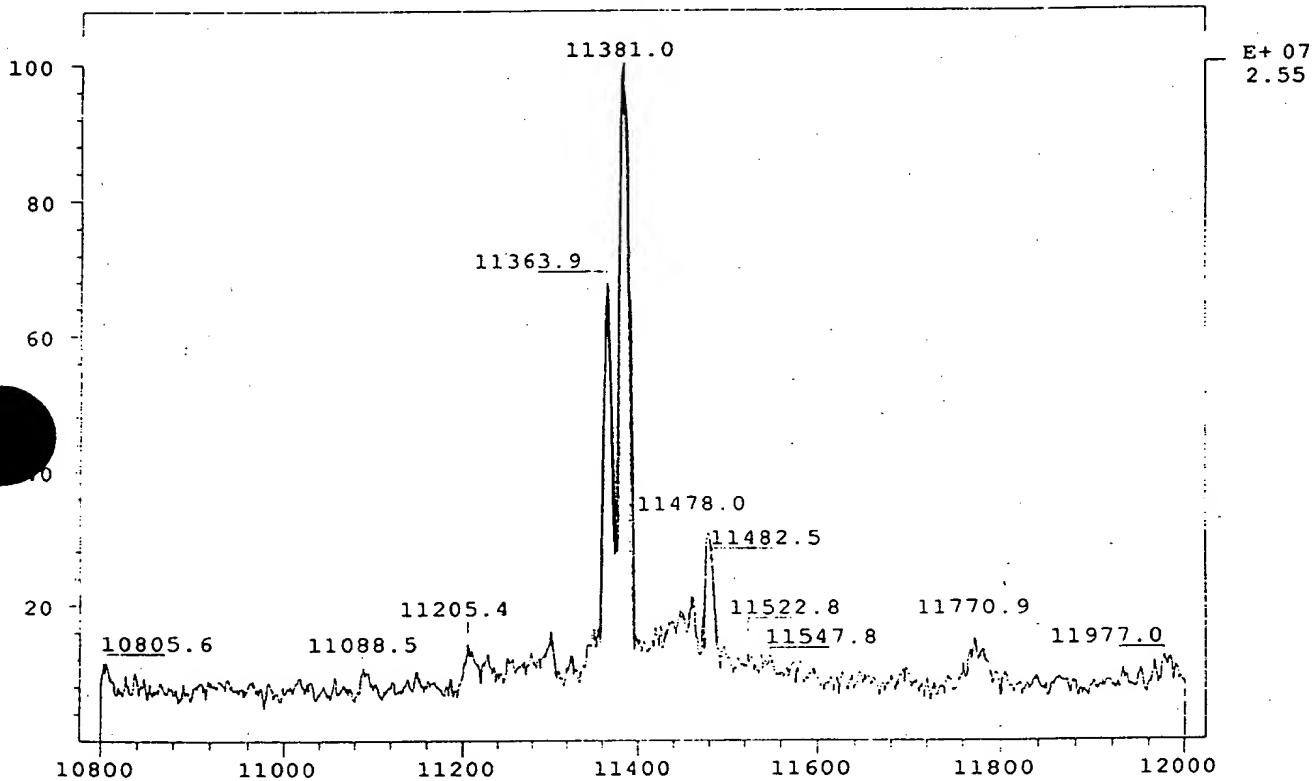
Figur 1



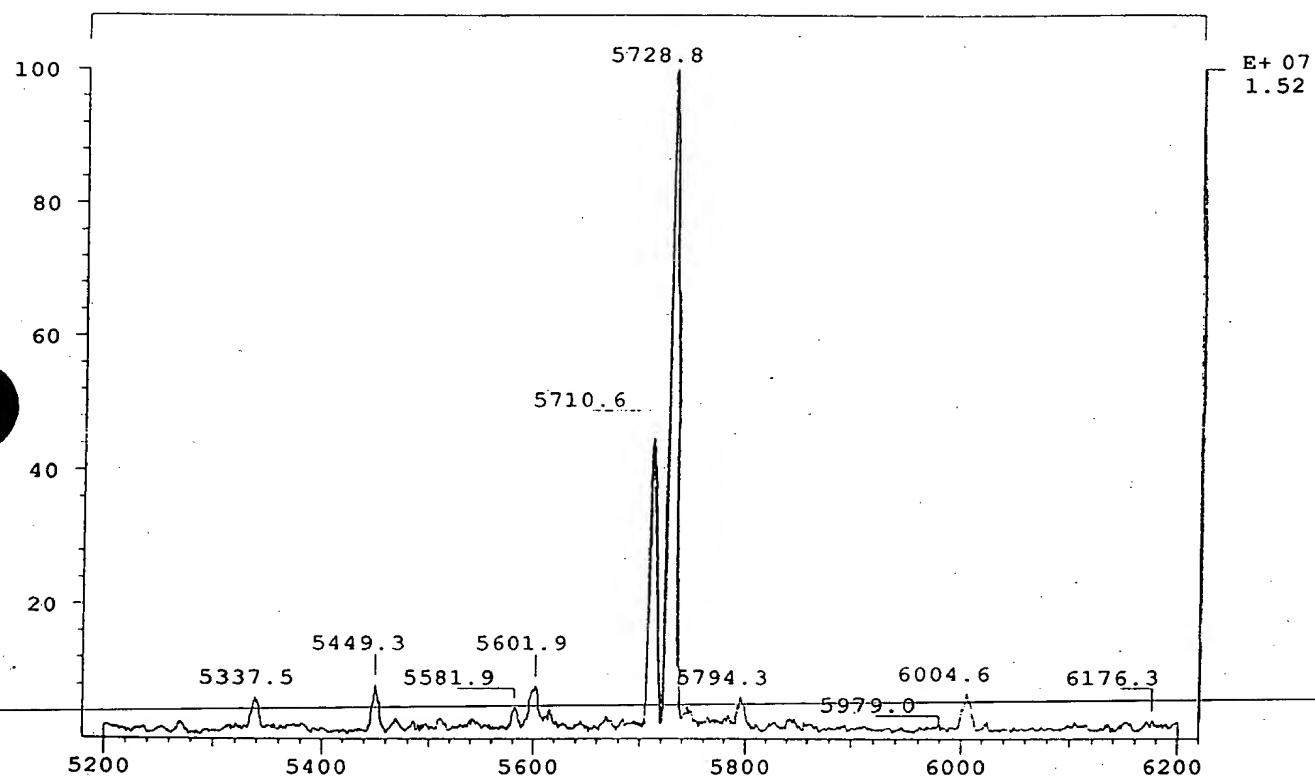
Figur 2



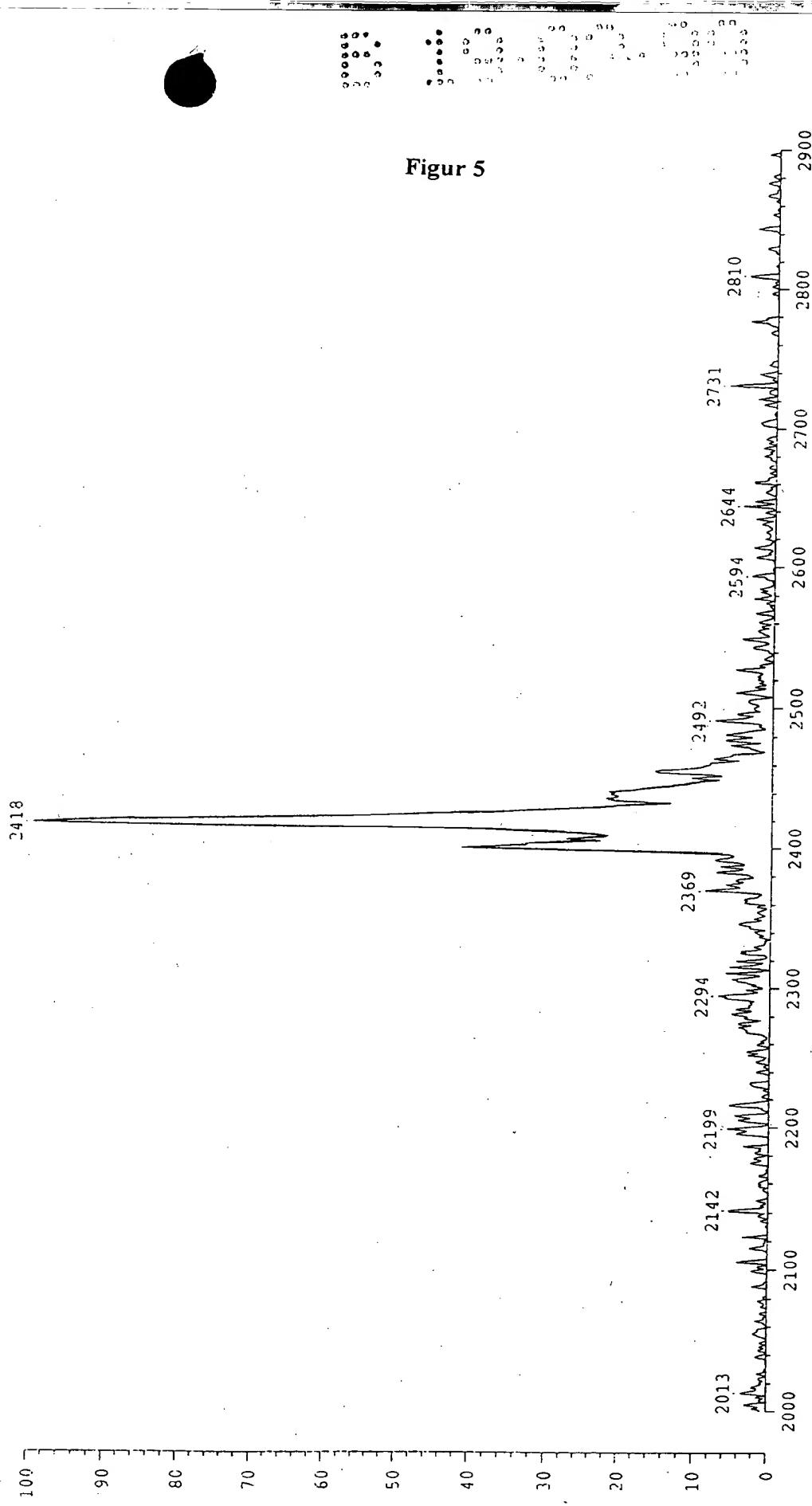
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

